NOTE SUR UN NOUVEL APPAREIL D'ÉLECTROPHORÈSE HORIZONTALE POUR GEL D'AMIDON*

J.-C. BARON

Océanographe biologiste de l'O.R.S.T.O.M. Dakar (Sénégal)

RÉSUMÉ

Un nouveau type d'appareil pour électrophorèse est présenté ici. Conçu et réalisé par l'auteur pour traiter en série 30 sérums en gel d'amidon il peut aussi être utilisé avec des gels d'agarose, de polyacrylamide ou des gels mixtes ainsi que pour l'électrophorèse préparative sur papier ou autre substrat. Le contact entre le gel et le tampon est direct, le système réfrigérant est incorporé à l'appareil et le couvercle plonge dans le tampon.

ABSTRACT

A new apparatus for electrophoresis, allowing to analyse 30 samples of sera through starch gel in the same run, has been conceived and developed by the author. Different other substrates such as paper, agar, polyacrylamide, can also be used. The contact between gel and buffer is direct, the cooling device is incorporated in the apparatus and the cover plunges in the buffer.

INTRODUCTION

La recherche de groupes sériques chez les poissons nous a amené à utiliser les techniques d'électrophorèse et en particulier l'électrophorèse en gel d'amidon qui permet de séparer les différents constituants d'un sérum selon leurs charges électriques mais aussi selon leurs dimensions moléculaires grâce à la trame du gel jouant un rôle de filtre. Décrite par SMITHIES en 1955 (7) cette technique a été l'objet de divers perfectionnements et de nombreuses adaptations ont été réalisées selon les besoins des chercheurs. Citons à titre d'exemple les modifications techniques apportées par FINE, WASCZENKO, LOEB et MOULLEC (3) ou encore la technique de microélectrophorèse en gel d'amidon mise au point par MOURAY, MORETTI et FINE (6).

La technique classique d'électrophorèse en gel d'amidon illustrée par d'excellentes photographies a été décrite par FINE et MORETTI (2) et reprise récemment dans le livre « Techniques d'électrophorèse de zones » de J. M. FINE et C. ROPARTZ (4).

D'une façon générale l'amidon est coulé dans un support donnant un gel d'une vingtaine de centi-

(*) Le descriptif de cet appareil est paru en juin 1971 sous forme d'une note multigraphiée (3 pages et 2 figures) au Centre O.R.S.T.O.M. de Dakar. Référence n° 1981 JCB/ac.

mètres de long et environ 8 cm de large permettant d'étudier en moyenne 3 sérums. L'unité de travail constituée par 2 cuves à électrodes permet de traiter un maximum de 15 échantillons au cours d'une même électrophorèse (5 gels en parallèles).

On constate couramment que les distances parcourues par les différents constituants d'un même échantillon sont variables d'un gel à l'autre au cour d'une même électrophorèse de 5 gels en parallèle. Ceci n'est pas très important lorsqu'il s'agit d'un matériel bien connu comme le sérum humain par exemple, mais entraîne des incertitudes dans la comparaison des différentes bandes lorsqu'il s'agit de sérum peu connu comme celui des sardinelles actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Ainsi les estérases de ce sérum se révèlent en plusieurs bandes qu'il est difficile de comparer d'un gel à l'autre du fait même d'un manque de contiguïté entre les échantillons. Une solution simple consiste alors à relier entre eux les 5 gels pour n'en faire qu'un seul de grande dimension (comme dans l'électrophorèse préparative) et il devient aisé de comparer de proche en proche les différents échantillons.

Comme le dit CREYSSEL (1) : « La condition fondamentale d'une séparation électrophorétique sur substrat est l'homogénéité des conditions physiques capables d'influencer le déplacement des particules chargées dans le champ électrique ». Or le passage du courant provoque un effet Joule et la quantité de chaleur dégagée par effet Joule ($Q = RI^2t/j$) entraîne une variation thermique dont l'un des effets est de provoquer une évaporation difficilement contrôlable entraînant une distorsion des fronts de migration et une augmentation de la force ionique du tampon.

Nous avons donc cherché à limiter cette évaporation et à la standardiser au maximum tout d'abord par l'usage d'un couvercle original qui repose dans le tampon, réalisant un joint hydraulique au niveau des bacs, et qui détermine une enceinte de faible volume au-dessus du gel. Le toit en pente de ce couvercle évite la retombée de gouttelettes d'eau sur le gel. Ensuite par une réfrigération sous-jacente à l'aide d'un circuit d'eau réfrigérée circulant sous le gel. L'ensemble de ces dispositions permet d'augmenter la tension, donc de diminuer le temps de migration, sans augmenter le risque de dénaturation des protéines.

Par ailleurs la répartition du courant est homogénéisée par les murs du couvercle qui sont percés de nombreux trous et dont la résistance fixe réduit les variations de l'intensité et limite les variations de pH, aux bornes, variations minimisées en outre grâce au renouvellement du tampon par un système de goutte à goutte et de trop-plein.

Dans l'électrophorèse classique les contacts entre le gel et le tampon sont réalisés avec du papier d'amiante COFRAM et selon la manière de disposer ces contacts la migration obtenue est plus ou moins grande pour un même temps d'électrophorèse. La réalisation d'un contact direct entre le gel et le tampon apporte donc une simplification qui supprime en outre la discontinuité entre le gel et le tampon, génératrice d'irrégularités.

Notons aussi que le support du gel étant solidaire des bacs et le cadre à gel étant bloqué en position fixe, les gels ont toujours la même configuration et la même position par rapport aux caractéristiques de l'appareil et en particulier la distance entre l'électrode et l'interface tampon-gel est constante (alors que la distance électrode-papier COFRAM est variable).

Un aspect non négligeable dans le traitement des échantillons est leur prix de revient par unité. Dans le cas courant d'une électrophorèse de 3 sérums migrant sur 15 mm de large et 120 mm de long, seul 1/3 du gel d'amidon est le siège d'un transport de protéines alors qu'avec notre appareil la moitié du gel est réellement « fonctionnel ». Il constitue une unité de travail permettant de traiter 30 échantillons à la fois donc de doubler le rendement.

Enfin l'appareil et ses accessoires peuvent être fabriqués à très peu de frais au laboratoire.

1. DESCRIPTIF

La description de l'appareil est donnée en quatre parties : les bacs et l'enceinte réfrigérante, le couvercle, les cadres et les accessoires. Chaque pièce est identifiable par un numéro de plusieurs chiffres. Les dimensions sont données en millimètres, les trous mesurent 10 mm et les tubes ont un diamètre extérieur de 10 mm pour une lumière de 8 mm.

1.1. Bacs et enceinte réfrigérante.

A. SUR UN PLATEAU DE BASE (520×330×5) SONT SOUDÉS 4 MURS EXTÉRIEURS, 7 CLOISONS VERTICALES ET 6 CALES.

1.1.1. *Deux murs* (510×70×5) avec une encoche (h = 20, l = 15) pour le passage de la fiche de l'électrode.

1.1.2. *Deux murs* (330×70×5) dont la hauteur est réduite à 50 mm, à 95 mm des extrémités à la suite de deux décrochements de 15 puis de 5 mm.

1.1.2.1. Un mur est percé de 2 trous pour la fixation des tubes à trop-plein se déversant

dans la gouttière et qui assurent une hauteur minimum de tampon de 46 mm. Ces tubes sont reliés l'un à la base, l'autre au plafond de la gouttière inclinée (300, diamètre 20) qui se termine par un tube de 30 mm de long.

1.1.2.2. L'autre mur est percé de 6 trous :

— Deux trous pour la fixation des tubes de goutte à goutte (60) débordant de 25 mm vers l'extérieur et de 30 mm vers l'intérieur où l'extrémité est biseautée.

— Deux trous pour la circulation du réfrigérant dans lesquels sont fixés deux tubes (25). Deux trous pour la vidange du réfrigérant.

1.1.3. *Deux cloisons verticales* (510×35×5) délimitant les bacs à tampons d'une largeur de 70 mm

1.1.4. *Deux cloisons verticales* (510×50×5) supportant le plateau à gel avec une fenêtre (15×35) permettant le passage du réfrigérant.

1.1.5. *Trois cloisons* en chicane (495×50×3) équidistantes.

1.1.6. *Trois cales* (15×10×10) sont réparties au fond de chacun des bacs pour surélever les électrodes (Apelab CT 50) de 10 mm.

B. Sur les murs et les cloisons sont soudés 12 cales et 1 support a gel en 3 pièces :

1.1.7. *Trois sortes de cales verticales* sont soudées aux murs (1.1.2.) pour bloquer les électrodes, les murs du couvercle et les cadres.

1.1.7.1. quatre cales (5 ×10, h = 45)

1.1.7.2. quatre cales (25×10, h = 45)

1.1.7.3. quatre cales en forme d'équerre (45 × 10, h = 50).

1.1.8. Le support du gel est formé par 1 plateau horizontal et 2 rebords horizontaux qui délimitent en même temps l'enceinte réfrigérante.

1.1.8.1. *Le plateau* (520×140×5) est soudé par-dessus les murs (1.1.2.), les cloisons (1.1.4.) et les chicanes (1.1.5.).

1.1.8.2. *Chacun des rebords* (510×20×5) est soudé par-dessus la cloison (1.1.3.) et au flanc de la cloison (1.1.4.).

1.2. Couvercle.

Le couvercle de 3 mm d'épaisseur est constitué d'un toit à deux pentes, de 2 pignons et de 2 murs plongeant dans le tampon.

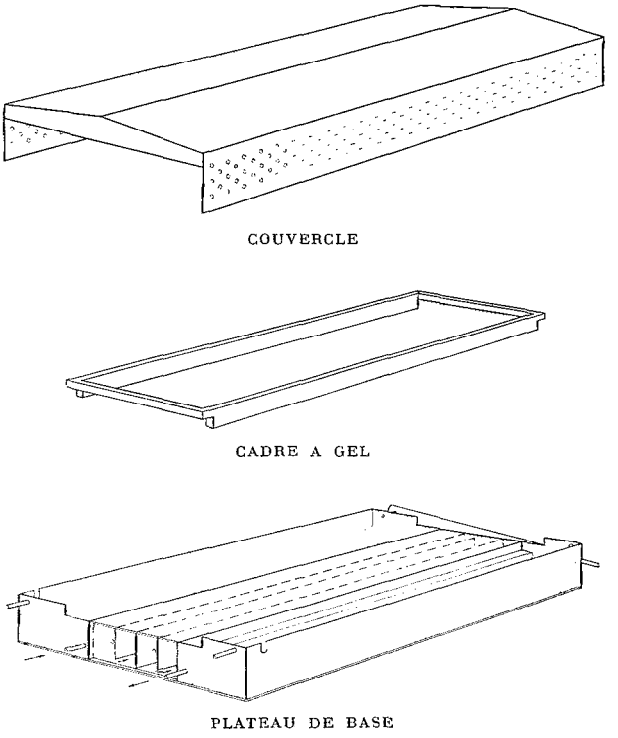


Fig. 1. — Représentation schématique de l'appareil d'électrophorèse.

1.2.1. *Le toil* a 2 pentes d'environ 121 mm de large chacune pour 510 mm de long. Il est soudé par dessus les pignons.

1.2.2. *Les pignons* ont une hauteur au sommet de 30 mm et 15 mm aux extrémités pour une largeur de 240 mm. Ils reposent sur le plateau à gel lorsque le cadre est ôté.

1.2.3. *Les murs* (504×70×3) sont percés de trous de 4,5 mm de diamètre répartis en quinconce sur des rangées équidistantes de 8 mm et reposent au fond des bacs.

1.3. Cadres.

Deux sortes de cadres sont utilisés : un cadre pour le coulage des gels et un cadre pour l'électrophorèse préparative sur papier.

1.3.1. *Le cadre à gel* est constitué par un cadre proprement dit (520×180×9) délimitant une fenêtre (490×160×9) et reposant sur deux pieds (490×15×10). Il est bloqué contre les décrochements des murs (1.1.2.). Ce cadre délimite avec le plateau à gel un volume d'environ 705cm³ et avec les rebords un volume d'environ 75 cm³ soit un total arrondi

de 780 cm³ correspondant à un gel d'amidon de 9 mm d'épaisseur.

1.3.2. *Le cadre à papier* (520×180×25) repose sur le plateau par 2 bords (180×20×5) et une séparation mitoyenne (180×20×5) délimitant deux fenêtres de migration de 230 mm de large. Il s'appuie en outre sur les rebords (1.1.8.2.) par 4 pieds (490×25×4) délimitant les deux fenêtres de migration (140 mm de large) et quatre fenêtres de tension (230×10). Bloqué contre les décrochements des murs (1.1.2.) ce cadre sous-tend deux feuilles de papier Whatmann nº 3 (280×230).

1.4. Accessoires.

1.4.1. *La réglette-repère* (550×50×4). Le bord supérieur est gradué, laissant une garde de 30 mm à chaque extrémité plus 22,5 mm pour tenir compte des effets de bord. Les 445 mm restant sont divisés en 30 espaces de 10 mm numérotés de 1 à 30 et séparés les uns des autres par des plages sombres de 5 mm. La partie inférieure comporte trente trous borgnes de 8 mm de diamètre percés à 4 m du bord, en face des trente numéros.

1.4.2. *Le multiapplicateur.* Il comprend un portoir à pipettes et une cuve de rinçage. Le portoir est constitué par une plaque supérieure (490×30×4) percée de 30 trous de 7 mm espacés de 8 mm et d'une plaque inférieure (455×20×3) percée de 30 trous de 3,5 mm espacés de 11,5 mm. Les deux plaques sont séparées par 2 murs (455×25×3), les petits trous étant évidemment en face des grands trous. La cuve de rinçage (470×80×45) fabriquée avec de l'altuglass de 4 mm comporte une cloison médiane de 45 mm de haut délimitant deux compartiments, l'un de lavage, l'autre de rinçage.

1.4.3. *Le chevalet.* Il s'adapte sur le mur (1.1.2.2.) et sert à soutenir la glissière. Il est constitué de deux étriers (70×55×5) solidaires d'une barre transversale (170×20×5) et repose d'une part sur les rebords (1.1.8.2.) et d'autre part sur la paillasse.

1.4.4. *La glissière* comprend un plateau (490×160×5) avec deux rebords latéraux (490×10×3) et un rebord de blocage (140×10×3).

1.4.5. *Les bacs de coloration.* Leurs dimensions permettent de recevoir la glissière.

1.4.6. *La plaque de recouvrement* est déposée sur le gel après le coulage (520×180×3).

2. RÉALISATION DE L'APPAREIL

L'appareil est réalisé en Altuglass à l'aide d'une colle au chloroforme fabriquée à partir des déchets de coupe. Les électrodes linéaires de platine modèle CT 50 (Apelab) sont directement utilisées (mais on peut aussi bien les fabriquer soi-même). Une pompe assure la circulation du réfrigérant en circuit fermé. En circuit ouvert on peut relier l'enceinte sur le robinet d'eau froide.

2.1. Matériel nécessaire.

2.1.1. *Matière première.* Trois plaques d'Altuglass d'épaisseurs 3 mm, 4 mm et 5 mm. Vingt centimètres de tuyau d'Altuglass de 10 mm de diamètre et 30 cm de 20 mm de diamètre. Un litre de chloroforme. Les épaisseurs d'Altuglass de 9 mm, 10 mm et 15 mm sont obtenues par collage (4+5, 5+5 et 5+5+5).

2.1.2. *Outillage.* Un ensemble polyrex (bloc moteur, scie circulaire, lapidaire, perceuse), un étau, des serre-joints. Une scie à métaux, deux limes, une queue de rat, un réglet, une équerre, une pointe sèche, un compte-gouttes, un pinceau. Du papier de verre et du papier de carrossier (nº 320 et 400).

2.2. Découpage.

2.2.1. *En 3 mm* : Trois cloisons 1.1.5. (495×50). Le couvercle comprenant : 1 toit 2.1. (2 fois 510×122), 2 pignons 2.2. (240×30) et 2 murs 2.3. (504×70). La plaque de recouvrement (520×180). Pour le multiapplicateur : 1 plaque inférieure (455×20), plaque supérieure (490×30), 2 murs (455×25), 1 cloison médiane (462×45). Pour la glissière : 2 rebords (490×10) et 1 rebord (140×10).

2.2.2. *En 4 mm* : Pour le cadre à papier : 4 pieds (490×25). La réglette-repère (550×50). Pour le multiapplicateur : 2 murs (470×80), 2 murs de (80×37) et un fond (470×37).

2.2.3. *En 5 mm* : Le plateau de base (520×330), 2 murs 1.1.1. (510×70), 2 murs 1.1.2. (330×70), 2 cloisons 1.1.3. (510×35), 2 cloisons 1.1.4. (510×35), 1 support à gel 1.1.8.1. (520×140), 2 rebords 1.1.8.2. (510×20). Pour le cadre à papier : 2 bords et 1 séparation (180×20). Quatre cales 1.1.7.1. (45×10). Pour la glissière : un plateau (490×160). Pour le chevalet : 2 étriers (70×55) et une barre (170×20).

2.2.4. *En 9 mm* : Pour le cadre à gel, 2 bords (180×15).

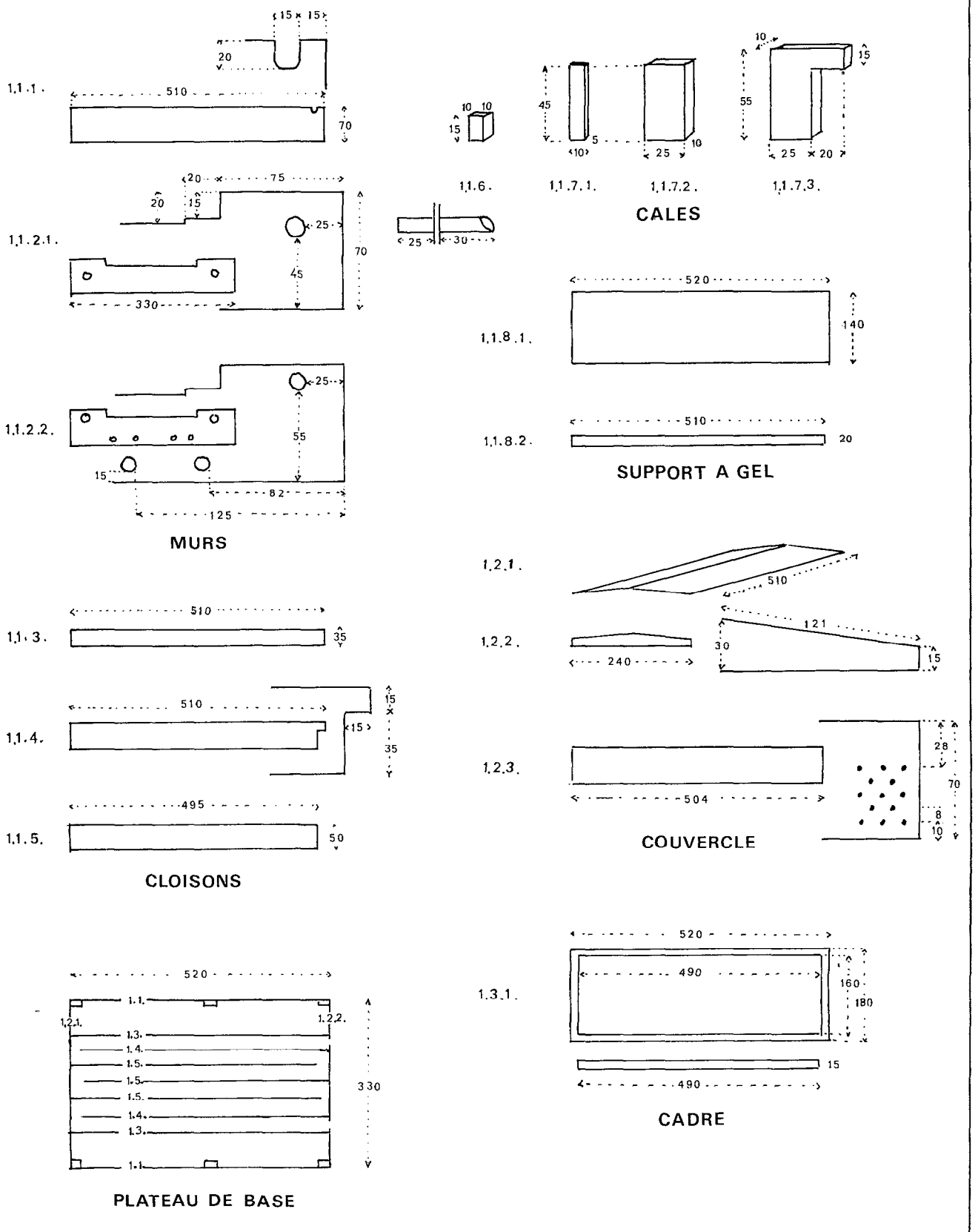


Fig. 3. — Pièces détachées de l'appareil.

2.2.5. *En 10 mm* : 6 cales 1.1.6. (15×10), 4 cales 1.1.7.2. (25×45), 4 cales 1.1.7.3. (50×45).

2.2.6. *En 15 mm* : Les deux pieds du cadre à gel (490×10).

2.2.7. *Tube de 10 mm* : 2 pour le goutte à goutte (60), 2 pour le réfrigérant (25), 1 pour la gouttière (30) et 2 pour les trop-pleins.

2.2.8. *Tube de 20 mm* : 30 cm pour la gouttière.

2.3. Perçage.

2.3.1. *Mèche de 3,5 mm* : 30 trous dans la plaque inférieure du multiapplicateur.

2.3.2. *Mèche de 4,5 mm* : trous des murs 1.2.3. du couvercle.

2.3.3. *Mèche de 7 mm* : 30 trous dans la plaque supérieure du multiapplicateur.

2.3.4. *Mèche de 8 mm* : 30 trous borgnes sur la réglette-repère sur laquelle on a tracé les divers repères.

2.3.5. *Mèche de 10 mm* : les trous correspondant aux tubes de 10 mm : 2 trous sur le mur 1.1.2.1., 6 trous sur le mur 1.1.2.2.

2.4. Finition des pièces détachées.

Découper les diverses encoches des pièces, les poncer au lapidaire et à la lime puis au papier de verre et au papier de carrossier (sauf les bords destinés au collage).

2.5. Assemblage.

Les diverses pièces sont collées dans l'ordre suivant à l'aide de chloroforme :

(a) Sur le plateau de base, coller les 4 murs et les 7 cloisons. Vérifier l'étanchéité des bacs à tampon.

(b) Ajuster le plateau horizontal et les deux rebords. Coller les tubes du réfrigérant, boucher les trous de vidange et vérifier l'étanchéité de l'enceinte réfrigérante.

(c) Coller les diverses cales.

(d) Réaliser le couvercle, les cadres et les accessoires.

3. MODE D'EMPLOI

3.1. Coulage du gel.

Une bulle d'air introduite dans l'enceinte réfrigérante permet de vérifier l'horizontalité du plateau sur lequel est coulé le gel. Le cadre à gel est ensuite fixé sur ce plateau, bloqué contre les décrochements des murs et l'étanchéité est réalisée par 4 bandes adhésives.

Un gel d'amidon de 780 cm³, concentré à 12 %, est réalisé selon la méthode classique dans un erlenmeyer de 2 litres et versé dans le cadre. Le gel, recouvert d'une plaque d'Altuglass de 3 mm, refroidit une demi-heure à la température du laboratoire puis 1 heure en chambre froide (ou au frigidaire). Après solidification il est décollé du cadre à l'aide d'un grattoir à papier et le cadre est ôté. Si l'on désire garder le gel pour le lendemain, le cadre est laissé, le gel est recouvert de papier filtre imbibé de tampon et le couvercle est posé pour former une chambre humide.

Pour le gel d'agarose une plaque de verre est déposée sur le support et 600 cm³ d'agarose à 1,5 % sont coulés dans le cadre.

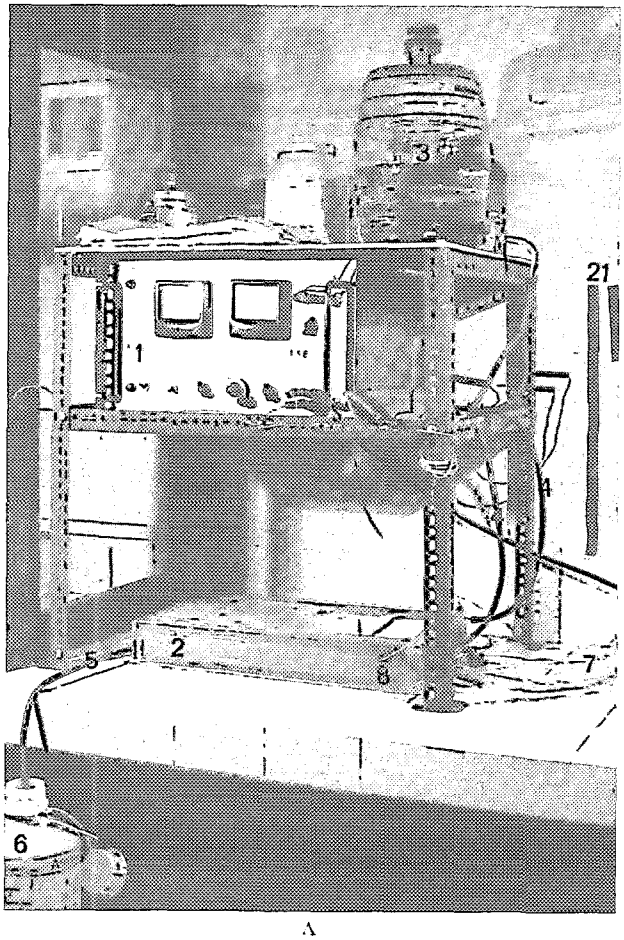
3.2. Insertion des échantillons.

Divers essais nous ont fait abandonner pour les travaux de routine l'inclusion par des réservoirs pratiqués à l'emporte-pièce. En effet la ligne des réservoirs représente un point faible du gel et des cassures se forment à son niveau, de plus l'utilisation d'amidon soluble lors de l'inclusion est délicate et pose des problèmes de standardisation concernant la température et le rapport amidon soluble-sérum.

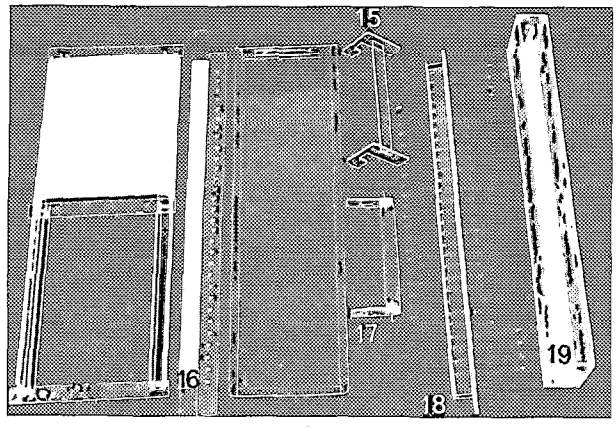
L'emploi de morceaux de papier imbibés de sérum donne d'aussi bons résultats et offre plus de régularité dans l'emploi. La réglette servant au dépôt des échantillons est posée sur le gel, appuyée contre les décrochements des murs. Trente fentes sont pratiquées en face des trente repères à l'aide d'une microspatule pour pesée et 30 morceaux de papier Whatman n° 3 de dimension 10×10 mm sont déposés sur les trous borgnes. Le multiapplicateur muni de trente pipettes Pasteur permet de prélever directement dans leurs tubes les 30 échantillons et de les déposer sur les 30 papiers qui s'en imbibent. Ils sont introduits ensuite dans les fentes du gel à l'aide d'une paire de pinces.

3.3. Migration électrophorétique.

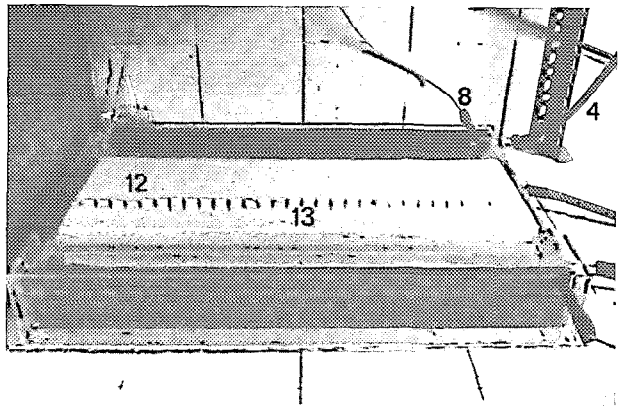
Le couvercle est installé, en prenant garde à ce que des bulles d'air ne soient pas emprisonnées dans les trous des murs, le réservoir à tampon est raccordé au goutte à goutte, la gouttière de trop-plein est raccordée à la bonbonne de récupération, le réfrigérant est mis en circulation et les électrodes sont branchées. On met alors le contact au redresseur de courant qui indique 120 volts pour 200 ma soit une d.d.p. de 4,5 volts par centimètre de gel. Après trente minutes de migration les papiers ayant servi à



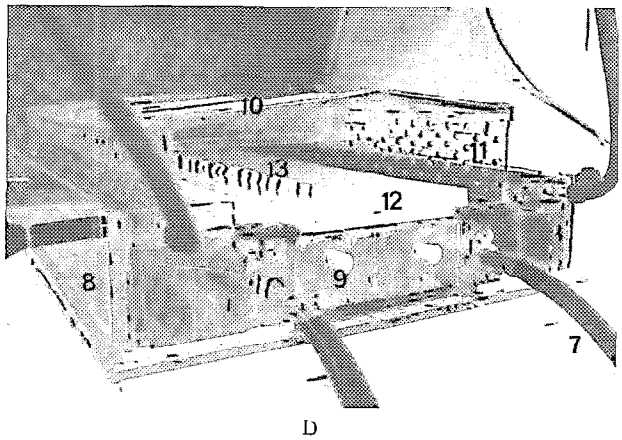
A



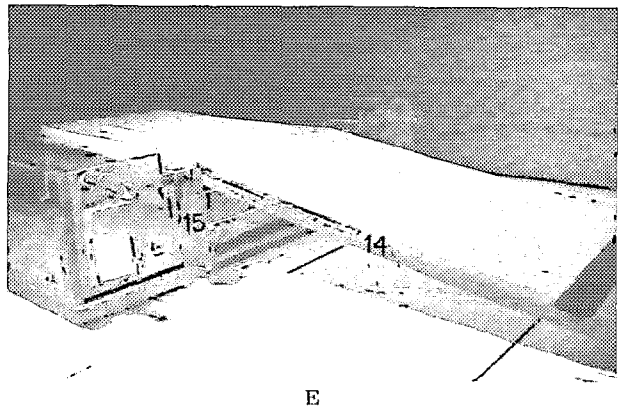
B



C



D



E

Planche I : A. Dispositif d'électrophorèse ; B. Accessoires ; C. Inclusion des 30 échantillons ; D. Mise en place du toit ; E. Glissement du gel sur la glissière.

Légende : 1. redresseur de courant, 2. appareil d'électrophorèse, 3. réservoir à tampon, 4. tuyau de goutte à goutte, 5. gouttière de trop plein, 6. récupération du tampon, 7. réfrigération, 8. branchement des électrodes, 9. bouchon de vidange du réfrigérant, 10. couvercle en toit, 11. mur du couvercle percé de trous, 12. gel d'amidon, 13. papiers d'inclusion, 14. glissière à gel, 15. chevalet, 16. réglette repère, 17. scie à couper le gel, 18 et 19. multiapplicateur et son bac de lavage, 20. cadre à papier, 21. bande adhésive.

l'inclusion sont ôtés et l'électrophorèse se poursuit durant 6 heures au même voltage.

Le tampon utilisé, dérivé du tampon de Ashton mais de force ionique plus faible, est un tampon discontinu borate-lithium, tris-citrique. La solution tampon pour les bacs, de pH = 8,4 est la suivante : Hydroxyde de lithium 5,244 g et acide borique 30,920 g pour 5 litres d'eau distillée. La solution utilisée pour le gel comprend 1 volume de la solution précédente pour 9 volumes de tampon tris-citrique (Tris 12,1 g et acide citrique 3,2 g pour 2 litres d'eau distillée).

3.4. Révélation des protéines.

L'électrophorèse terminée, le couvercle est ôté, le tampon des bacs est siphoné en partie et les pieds du gel sont coupés et enlevés. On passe alors un fil métallique entre le gel et son support pour supprimer les adhérences possibles. Le chevalet et la glissière légèrement humectée sont mis en place et le gel est poussé sur la glissière. A l'aide du fil métallique on coupe le gel dans le sens de la longueur. La tranche supérieure (6 mm) est ôtée et déposée dans une seconde glissière; la tranche inférieure de 3 mm reste au fond de la première glissière qui est immergée dans un bain révélateur, à moins que l'on ne badigeonne la surface du gel avec le révélateur. Deux tranches de 3 mm sont encore disponibles pour 2 révélations différentes. On peut ainsi révéler 2 enzymes et effectuer la coloration générale des protéines au noir-amido sur les 30 échantillons ou encore rechercher la même enzyme avec 2 substrats différents (par exemple : α - naphtylacétate et β naphtylbutyrate) ainsi que sa sensibilité à un inhibiteur (par exemple l'ésérine).

4. RÉSULTATS

4.1. Electrophorèse en gel d'amidon.

4.1.1. *Sérum humain* (1) : Nous avons effectué un essai de répétition en faisant migrer 30 échantillons du même sérum côte à côte. Comme on peut le constater sur la photographie (Planche II, A) la migration se fait selon un front très peu distordu et la répétition est parfaite d'un bord à l'autre de l'électrophorégramme, une protéine particulière pouvant être suivie de proche en proche même si la ligne est légèrement sinueuse.

4.1.2. *Sérums de mammifères* (2) : Les sérums de 5 chiens, 3 chevaux, 6 vaches, 2 chèvres et 2 moutons ont été traités en laissant les papiers d'inclusion (15 mm de large) pendant toute la durée de la migration, ce qui ne perturbe pas l'électrophorèse. On peut voir les électrophorégrammes obtenus sur la photographie B, planche II.

4.1.3. *Sérums de poissons* : Les sérums de 27 *Sardinella aurita* pêchées à Dakar le 22 juin 1971 (Lot 28) sont analysés avec le nouvel appareil. La tranche moyenne est colorée au noir amido pour une révélation des protéines totales (photographie D, planche II) et la tranche inférieure subit une révélation spécifique des estérases (photographie C, planche II). La contiguïté des divers échantillons permet une comparaison cohérente des 27 sérums à la fois.

4.1.4. *Extraits de tissus* : Des extraits de muscles blancs d'anchois *(Anchoviella guinensis)* et de mullets *(Mugil)* ainsi que des extraits de muscles rouges d'anchois ont subi une électrophorèse en gel d'amidon. La ligne d'inclusion des échantillons est alors plus éloignée de la cathode que pour des sérums. La photographie E, planche II illustre cette électrophorèse.

4.2. Electrophorèse en gel d'agarose.

Nous avons traité de cette façon 10 sérums humains d'africains malades (1) en présence d'un sérum normal témoin (européen) et 9 sérums de mammifères. Les inclusions ont été effectuées dans des réservoirs de 15 mm de large. Le tableau 1 rend compte des résultats obtenus par électrophorèse classique sur papier et la photographie A, planche III représente les migrations en gel d'agarose obtenues avec notre appareil.

(1) Les sérums humains nous ont été aimablement fournis par l'Institut Pasteur de Dakar ainsi que les résultats d'électrophorèse sur papier concernant les 10 sérums de malades.

(2) En provenance du Laboratoire National de Recherches Vétérinaires de Dakar-Hann.

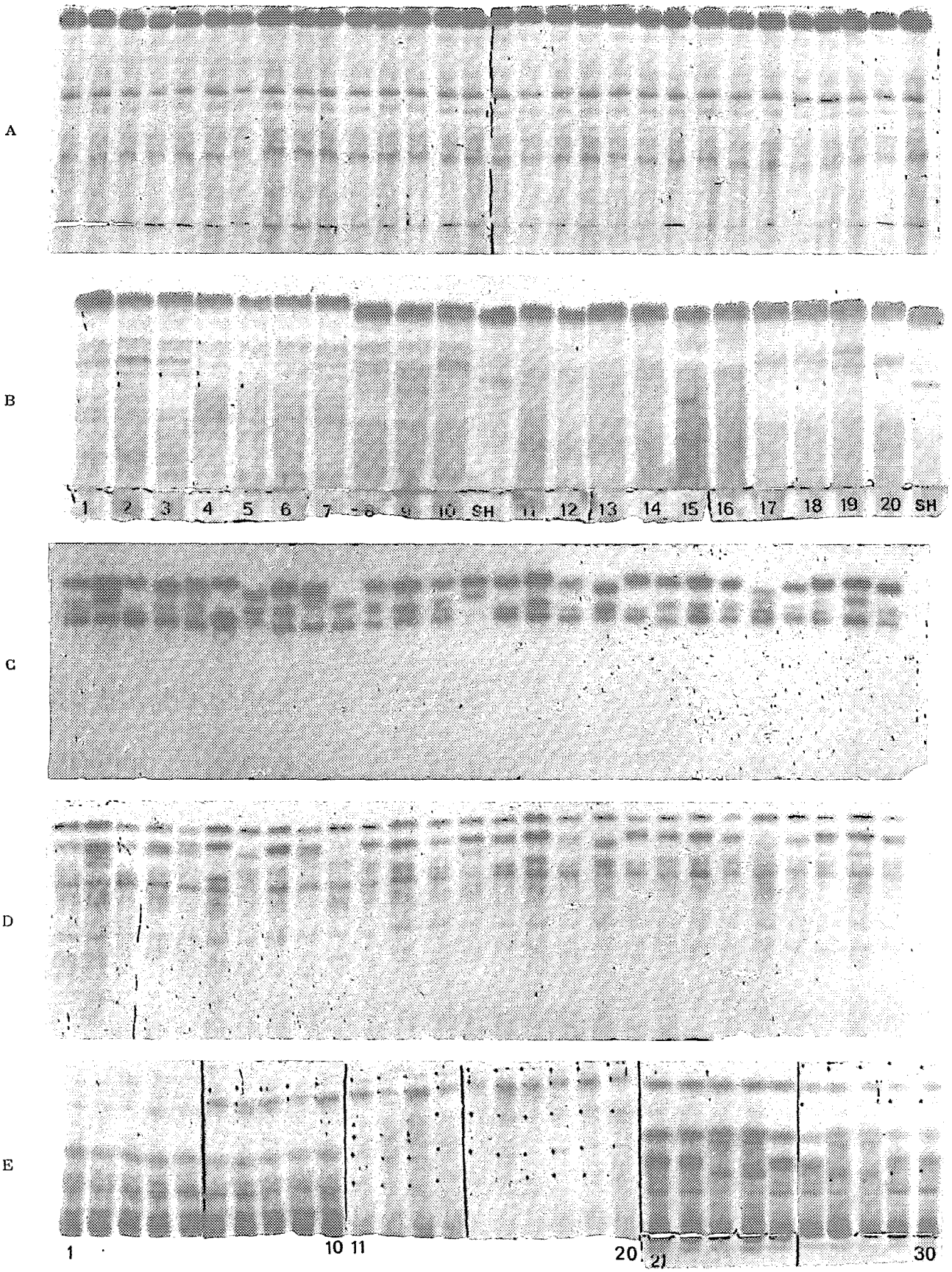


Planche II : Électrophorèse en gel d'amidon. A. *Sérum humain :* répétition du même sérum. B. *Sérums de mammifères :* 1 à 7, chiens ; 8 à 10 chevaux ; 11 à 16, vaches ; 17 et 18, chèvres ; 19 et 20, moutons. S. H. pour sérum humain. C et D. *Sérums de sardinelles :* révélation des estérases sur la tranche inférieure du gel (C) et coloration des protéines totales sur la tranche moyenne (D). E. *extraits de muscles de poissons :* muscles blancs (1 à 10) et muscles rouges (11 à 20) d'anchois. Muscles blancs de mugil (21 à 30).

TABLEAU I

Pourcentages des diverses fractions obtenues par électrophorèse sur papier de 10 sérums humains africains (malades)

Sérums N°	γ	β	α2	α1	Albumine
1	28,3	*16,9*	12,8	8,6	33,4
2	28,3	15,4	10,3	6,3	39,7
3	29,2	15	12	8	35,8
4	29,6	15,1	11,3	7,4	36,6
5	*38*	11,7	11,2	10,6	28,5
6	*31,5*	12,7	*17*	5	33,8
7	*32,4*	12,2	9,6	8,2	37,6
8	26,8	11,6	14,9	*9,1*	37,6
9	26,8	14,5	*23*	*9,2*	26,5
10	*23,4*	*17,5*	*18,7*	8,1	32,3
Limites normales	26,5 28,7	14 15,2	10,7 11,7	4,5 5,5	40,3 42,3

4.3. Électrophorèse préparative sur papier.

Deux électrophorèses préparatives sur papier Whatman n° 3 ont été effectuées, la première avec un sérum de poisson *(Coryphaena hippurus)* qui est traité ensuite en électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon et la seconde avec un sérum humain permettant de juger de la séparation obtenue (photographie B, planche III). Les conditions d'expérience sont les suivantes : 8 h 30 à 9 v/cm, tampon à pH = 8,7 (Véronal sodé 17,52 g — véronal acide 2,76 g - lactate de Calcium 0,768 g — eau distillée 2 litres).

4.4. Électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon.

A la suite de l'électrophorèse préparative sur papier du sérum de *Coryphaena hippurus* les diverses fractions protéiques sont récupérées après un découpage particulier du papier et mises à migrer en gel d'amidon perpendiculairement au premier sens de migration sur papier (photographie C, planche III).

5. DISCUSSION

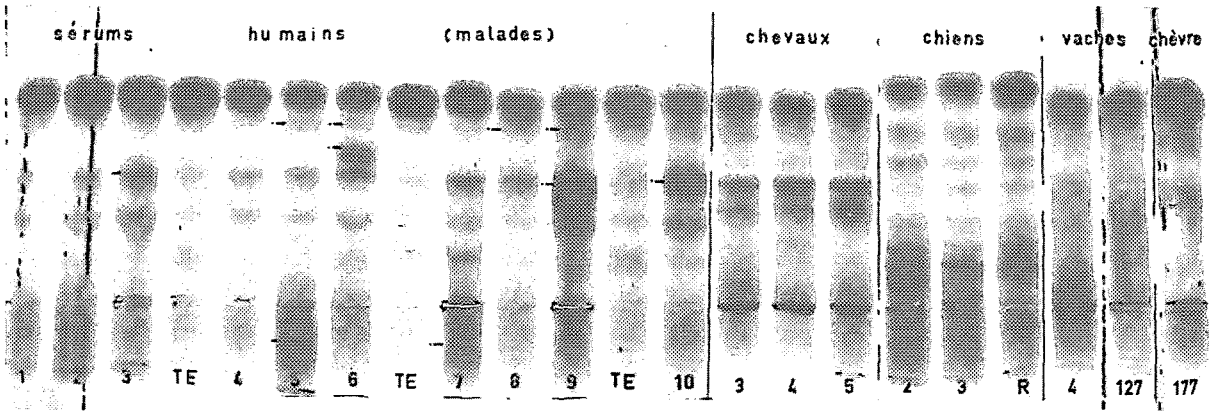
Le nouvel appareil présenté ici ne prétend pas rivaliser avec les nombreux appareils très perfectionnés que l'on peut acheter dans le commerce (*). Cependant pour un prix modique il répond à un besoin particulier qui est de traiter côte à côte un nombre important d'échantillons par électrophorèse en gel d'amidon. Ce substrat a gardé de nombreux adeptes malgré l'apparition sur le marché de nouveaux supports d'un maniement plus facile mais qui n'apportent pas toujours un pouvoir de séparation suffisant. Le temps « perdu » par la migration en gel d'amidon, qui est de l'ordre de plusieurs heures, est compensé par le nombre d'échantillons traités. En outre l'utilisation possible de l'appareil pour d'autres gels tel que l'agarose ou des gels mixtes amidon agarose est intéressante et il est adaptable aux électrophorèses préparatives sur papier (2 migrations à la fois) ou en gel d'amidon. L'électrophorèse préparative sur bloc de Pevikon n'a pas été essayée mais peut s'effectuer dans les mêmes conditions qu'avec l'appareil construit par MANUEL, SILBERZAHN et RICHARD (1). Les différences essentielles de notre appareil par rapport à ce dernier sont les suivantes : ensemble monobloc (cuve et bacs non mobiles), cadre ôté lors de l'électrophorèse permettant une bonne rétraction du gel, couvercle délimitant une enceinte fermée et évitant la retombée d'eau sur le gel, cuves à tampon de grande capacité et renouvellement continu du tampon, gel de 49 cm de front (au lieu de 28 cm) et de 9 mm d'épaisseur (au lieu de 6 mm) permettant d'effectuer 3 réactions différentes sur 30 échantillons.

5.1. Électrophorèse en gel d'amidon.

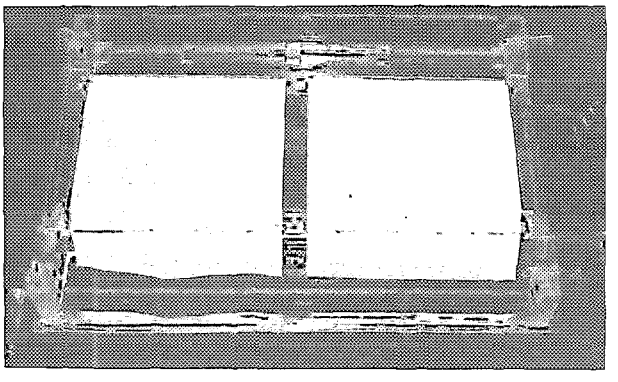
Les électrophorèses obtenues par la migration de 30 fois le même échantillon de sérum humain ou la migration de sérums de mammifères (Planche II) donnent une idée des performances de l'appareil. Nous avons traité en outre divers extraits de tissus et effectué des révélations enzymatiques sur des sérums de sardinelles. Si les essais de migrations en chambre froide (5 à 6°C) indiquent une tendance du gel à se craquer par contre la migration à la température du laboratoire (23°), même en absence de réfrigération est excellente. On peut aussi se passer d'un renouvellement continu de tampon par le goutte à goutte sans influer notablement sur les résultats.

Le redresseur de courant (ST3B-Apelab) nous limite par son milliampérage de 200 ma et pour cette intensité maximum on n'obtient qu'une différence de potentiel de 4,5 volts/cm de gel. Il est évident qu'un redresseur ayant d'autres caractéristiques doit permettre d'obtenir un voltage supérieur et une réduction du temps de migration.

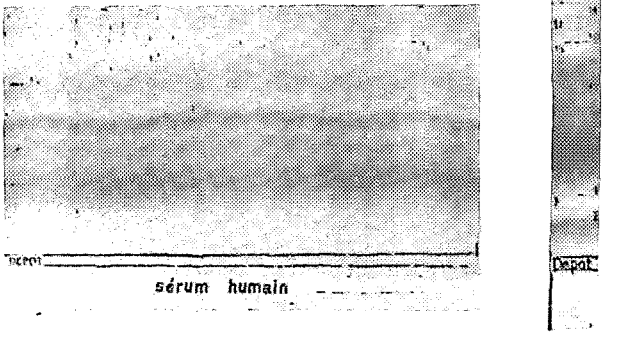
(*) APELAB, J. C. MONTAGNÉ, 35 rue des Écoles, 92. Bagneux, propose la construction de l'appareil décrit ici pour 4.500 F hors taxes (en date du 4 octobre 1971).



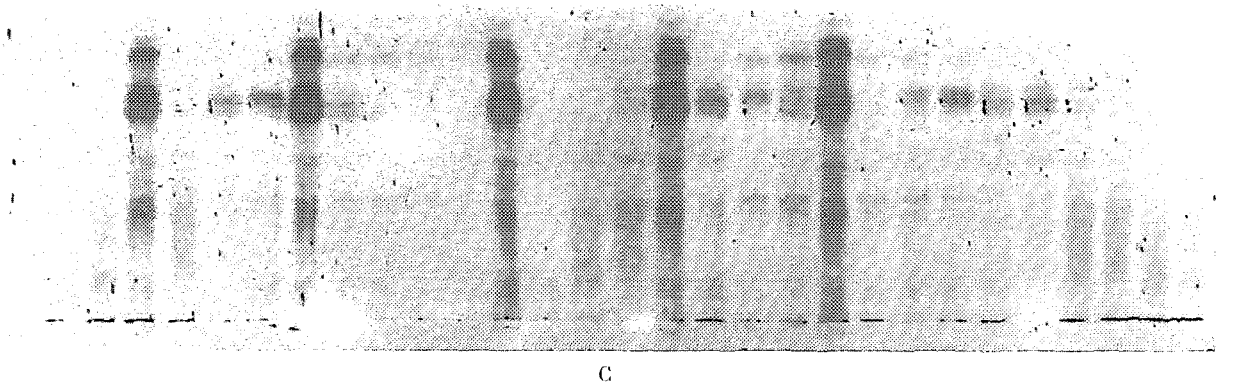
A



B 1



B 2



C

Planche III : A. Électrophorèse en gel d'agarose. Sérums humains pathologiques (1 à 10) et sérums de mammifères. B. Électrophorèse préparative sur papier. 1. papiers en place sur l'appareil ; 2. résultats : électrophorégramme de sérum humain et bande témoin de sérum de coryphène. C. Électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon. Migration des divers extraits obtenus à partir de la préparative sur papier de sérum de coryphène.

Notons qu'il est possible de laisser les papiers d'inclusion pendant toute l'électrophorèse ou de mouler des réservoirs d'inclusion lors du coulage du gel. Enfin la garde de gel prévue pour les effets de bord est suffisante pour autoriser l'inclusion éventuelle d'un échantillon supplémentaire de référence.

5.2. Électrophorèse préparative sur papier.

Les performances sont ordinaires et ne valent pas celles obtenues dans les appareils très élaborés comme celui de J. GROULADE par exemple (5). Cependant il est possible de réaliser de bonnes séparations sur papier Whatman n° 3 comme on peut le constater sur la photographie B, planche III. Le cadre permet de tendre 2 feuilles de papier de 280 mm de long sur 230 mm de large et de réaliser ainsi 2 électrophorèses à la fois. On peut déposer jusqu'à 0,8 ml de sérum sur un agitateur de verre placé sur le papier à 2 cm du bord cathodique ou directement à la pipette. Après 10 mn de migration l'agitateur est ôté. L'électrophorèse terminée, une bandelette médiane de 2 cm de large est prélevée pour être colorée. Les différentes fractions sont alors extraites de diverses manières ou laissées en place sur le papier qui est conservé congelé pour un usage ultérieur. La deuxième migration est effectuée en gel d'amidon soit par inclusion directe de bandes de papiers provenant de l'électrophorèse préparative soit par inclusion d'extraits.

Les détails techniques sont affaire de chacun et seule l'expérimentation permet de trouver des solutions personnelles aux problèmes que l'on rencontre en cours de manipulation. Dans le cas de l'électrophorèse sur papier par exemple où l'évaporation joue un rôle important les pignons du couvercle sont appliqués sur une bandelette de pâte à modeler qui augmente l'étanchéité de l'enceinte.

L'important ensuite est de se fixer un protocole que l'on répète d'une expérience sur l'autre en se servant du même appareil dans les mêmes conditions.

Manuscrit reçu au S.C.D. le 11 avril 1972.

BIBLIOGRAPHIE

[1] CREYSSEL (R.), 1968. — Appareillage simple d'électrophorèse préparative sur support *in* Techniques d'électrophorèse de zones. Éd. de la Tourelle, St Mandé, 283 p.

[2] FINE (J. M.), MORETTI (J. M.), 1961. — L'électrophorèse en gel d'amidon. Principe-Technique-Application. Le Pharmacien Biologiste 4 : 345-355.

[3] FINE (J. M.), WASZCZENKO (E.), LOEB (J.), MOULEC (J.), 1957. — Groupes sériques et électrophorèse sur gel d'amidon. 1. modifications techniques *Rev. d'Hematologie* 12 : p. 698.

[4] FINE (J. M.), 1968. — Électrophorèse en gel d'amidon *in* Techniques d'électrophorèse de zones. Éditions de la Tourelle, St Mandé, 283 p.

[5] GROULADE (J.), 1968. — Électrophorèse sur papier *in* Techniques d'électrophorèse de zones. Éditions de la Tourelle St Mandé, 283 p.

[6] MOURAY (H.), MORETTI (J.), FINE (J. M.), 1961. — Une technique de microélectrophorèse en gel d'amidon. Bull. Soc. Chimie Biologique Tome XLIII, 7-8 : 993-1003.

[7] SMITHIES (O.), 1955. — Zone electrophoresis in starch gels : group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 1955, 61 : 629-641.